

Gyors módszer a rhizobiumok aktivitásának kimutatására laboratóriumi viszonyok között

A. P. ALEKSZANJAN és A. D. NALBADJAN

Örmény Tudományos Akadémia Mikrobiológiai Intézete, Jereván (Szovjetunió)

A légköri nitrogén biológiai megkötésének mezőgazdasági jelentősége igen nagy, mivel a növények terméshozásának egyik fontos eszköze. Különösen jelentős szerepe van a pillangós virágú növények és a gyökérgümőkben élő N-kötő rhizobiumok szimbiózisának, mivel a biológiai úton megkötött légköri nitrogénnek mintegy felét az utóbbiak fixálják. A biológiai N-kötéshez a nitrát- és nitritreduktáz, valamint a nitrogenáz enzimek egyidejű jelenléte szükséges a mikroorganizmusok sejtjeiben. A 70-es évek végéig a fenti enzimeket külön-külön tanulmányozták, s csak az utóbbi években fordítottak figyelmet összefüggéseik megismerésére, miután kimutatták a közös kofaktorokat a molibdéntartalmú enzimeknél (KETCHUM és DOWNEV, 1975; MAK-KENNA et al., 1974; TATAROVA et al., 1976).

Az említett enzimek kölcsönhatásával kapcsolatban fontos információkat adnak a pillangós virágú növényekkel és N-kötő szimbiotáikkal folytatott vizsgálatok. Egyes szerzők (ALEKSZANJAN 1980; CHENIAE és EVANS, 1957; L'VOV et al., 1980; MANHART és WONG, 1979; ROMANOV et al., 1976) szerint a két enzim aktivitásának változásánál korreláció figyelhető meg, míg mások (FRANCO et al., 1979; HATAM és HUME, 1976; RANDALL et al., 1978) azt találták, hogy a nitrát- és nitritreduktáz, valamint a nitrogenáz maximális aktivitása a növények fejlődésének eltérő szakaszaira esik. A fenti vizsgálatok során azonban elsősorban a szezonális dinamikát tanulmányozták a szimbiózis viszonyai között.

Napjainkban nagy jelentősége van a rhizobium-aktivitás kritériumai kidolgozásának, mert segítségükkel gyorsan lehet értékelni az egyes rhizobium-tenyészetek N-kötő aktivitását, s ez felhasználható a szelekciós munka során. Kísérleteinkben olyan gyors laboratóriumi módszer kidolgozására törekedtünk, amely a nitrit- és nitrátreduktáz-aktivitás meghatározása alapján alkalmas a rhizobiumok nitrogenáz-aktivitásának kimutatására.

Anyag és módszer

A kísérleteket eredeti, valamint mutáns, szójából izolált rhizobium-törzsekkel folytattuk le. A kultúrákat babfőzet-agarlemezen inkubáltuk 28 °C hőmérsékleten. A lemezeken kinőtt telepeket replikációs módszerrel (LEDERBERG és LEDERBERG, 1952)

átvittük 2% KNO_3 -tartalmú babfőzet-agarlemez felületére, majd ezen inkubáltuk a baktériumok elszaporodásáig. Ezt követően az 1. és 2. reagenst öntöttük az NO_3 -tartalmú tápagar felületére. A reagensek összetétele az alábbi:

1. reagens: szulfanilsav (8 g), 1:20 arányban desztillált vízzel hígított kénsav (1000 ml).
2. reagens: alfa naftilamin (5 g), 1:125 arányban desztillált vízzel hígított kénsav (1000 ml).

Amennyiben a nitrátredukció végbemegy, a 2. reagens hozzáadását követően a rhizobium-telepek piros színűre festődnek.

A redukált nitrát és nitrit mennyiségét GALSZTJAN és SZAACKJAN (1970) módszerével határoztuk meg, amelyet a rhizobiumok vizsgálatához módosítottunk.

A nitrátredukáz enzim aktivitásának kimutatása céljából a kísérletbe vont gümöbaktériumokat 2% KNO_3 -at tartalmazó 7-es pH-jú babfőzetből készült ferde agaron inkubáltuk 28 °C-os termosztátban. 3—5 nap elteltével a kémcsövekbe 5 ml desztillált vizet pipettáztunk, amelyben az agar felületén kinőtt tenyészetet szuszpendáltuk. A szuszpenziót szűrőn át átlátszóra szűrtük, majd a szűrletet 50 ml-es mérőlombikba vittük, és 50 ml-re egészítettük ki. Ezt követően 20 ml szűrletet porcelán csészébe vittünk át, s 100 °C-on vízfürdőben szárazra pároltuk. A száraz maradékhoz 1 ml diszulfó-fenolsavat adtunk. 10 perc múltán 15 ml desztillált vizet öntöttünk hozzá, összekevertük a difenil-ammal, és 10%-os NaOH-dal az oldat kémhatását semlegesre állítottuk be. Az így nyert oldatot mérőlombikban 50 ml-re egészítettük ki, és az elszíneződést FEK-M típusú, szovjet gyártmányú fotokoloriméterrel mértük 400—500 nm hullámhosszú színszűrő közbeiktatásával, 5 ml-es küvetákban. Az oldatban levő nitrátot standardgörbe adataihoz viszonyítottuk, amelynek kiindulási mennyisége 16,32 g/l átkristályosított nitrát volt. A nitrátredukáz-aktivitást 1 g biomasszára jutó NO_3 mg-ban fejeztük ki. Kontrollként 2%-os KNO_3 -oldatot használtunk.

A nitritredukáz-aktivitás vizsgálatánál a szója rhizobiumokat a fentiekkel azonos módon szaporítottuk el, azonban a tápagarba 2% KNO_2 -et adtunk. 1 ml szuszpenziószűrletet pipettáztunk 50 ml-es mérőlombikba, és 5 ml desztillált vizet, valamint szulfanilsav (5%) és alfa-naftil-amin (0,1%) 1:1 arányú keverékéből 4 ml-t adtunk hozzá. A mérőlombikot jelig feltöltöttük desztillált vízzel. Miután a lombik tartalmát összeráztuk, 15 perc elteltével megmértük az elszíneződést fotokoloriméterrel, 500—600 nm hullámhosszú színszűrő felhasználásával.

A nitrit mennyiségi kimutatását kalibrációs görbe segítségével végeztük, amelynek kiindulási oldata 1,6 g/l KNO_2 -et tartalmazott. A nitritredukciós aktivitást mg-ban fejeztük ki, és 1 g biomasszára számítottuk át. Kontrollként 2% KNO_2 -et alkalmaztunk. A nitrát- és nitritredukciós aktivitás hibahatára $\pm 5\%$ volt. Az eredmények értékelését kéttényezős diszperziós analízissel végeztük.

A nitrogénáz-aktivitást gázkromatográfiás úton mértük az acetilénredukciós aktivitás alapján.

Az eredmények megvitatása

Az 1. táblázat adatai szerint a D-6, D-12 és UF-14 jelű rhizobium-törzsek aktívan redukálják a nitrátot, míg a D-15-ös, UF-8-as és UF-18-as mutáns tenyészetek közepes aktivitást tanúsítanak.

Megállapítottuk továbbá, hogy a mutáns rhizobium-kultúrák nitrit- és nitrátreduktáz-, valamint nitrogenáz-aktivitása között korreláció figyelhető meg. A korrelációs koeficiensek (r) értéke 0,89 és 0,70.

1. táblázat

Szójából izolált rhizobium-törzsek nitrit- és nitrátreduktáz-, valamint nitrogenáz-aktivitása

(1) Törzsek	NO ₃	NO ₂	NH ₄
	mg		μmol
a) Eredeti törzs N° 648	5,2(±1,04)	3,8(±0,56)	19,0(±1,74)
b) Mutáns törzs			
UF-8	9,5(±1,44)	5,6(±1,59)	5,5(±2,56)
D-15	10,8(±1,68)	6,3(±1,86)	22,2(±1,87)
UF-18	11,2(±1,19)	7,5(±1,08)	3,5(±1,43)
D-12	19,5(±1,30)	7,8(±0,53)	24,2(±2,60)
UF-14	26,3(±2,66)	13,6(±1,01)	25,0(±2,62)
D-6	26,7(±2,24)	9,5(±1,44)	40,0(±5,23)
c) Korrelációs koeficiens (r)	0,89		0,70

A fentiekből látható, hogy az általunk kidolgozott gyors módszer lehetőséget biztosít a rhizobium-törzsek előzetes szelekciójához, és segítséget nyújt az aktív N-kötő tenyészetek kiválasztásához laboratóriumi feltételek között. A nitrát- és nitritreduktáz-, valamint a nitrogenáz-aktivitás között fennálló összefüggés alapján az előbbieket alkalmazhatók a rhizobiumok aktivitásának előzetes elbírálására.

Összefoglalás

A szerzők gyors és egyszerű eljárást dolgoztak ki a rhizobiumok aktivitásának laboratóriumi elbírálásához a nitrát- és nitritreduktáz-aktivitás alapján.

Korrelációt állapítottak meg szójából izolált eredeti és mutáns rhizobium-törzsek nitrátreduktáz- és nitrogenáz-aktivitása között.

Irodalom

- ALEKSZANJAN, A. P., 1980. Nitritreduktaznaja aktivnoszt' kluben'kovüh bakterij. Teziszü dokladov VI. Sz'ezda Vseszojuznogo Mikrobiologicseskogo Obscsesztva. 31.
CHENIAE, G. M. & EVANS, H. J., 1957: On the relation between nitrogen fixation and nodule nitrate reductase of soybean root nodules. Biochim. biophys. Acta. **26**. 654—655.

- FRANCO, A. A., PEREIRA, J. C. & NEYRA, C. A., 1978. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **63**. 421—426.
- GALSZTJAN, A. S. & SZAANKJAN, E. G., 1970. Metod opredelenija aktivnoszti nitratreduktazü pocsvü. *Dokl. AN Arm. SzSzR.* **50**. 108—111.
- HATAM, M. & HUME, D. J., 1976: Relations between nitrate reductase activity and nitrogen accumulation in soybeans. *Canad. J. Plant Sci.* **56**. 377—384.
- KETCHUM, P. A. & DOWNEV, R. J., 1975. In vitro restoration of nitrate reductase: investigation of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa* nitrate reductase mutants. *Biochim. biophys. Acta.* **385**. 354—365.
- LEDERBERG, J. & LEDERBERG, E. M., 1952. Replica planting and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* **63**. 399—406.
- L'VOV, N. P., BURIHANOV, S. Sz. & KRETOVICS, V. L., 1980 Vzaimootnoseine nitrogenazü i nitratreduktazü v klethah azotfixatorov. *Prikl. Biochim. i Mikrobiol.* **16**. 805—817.
- MAK-KENNA, C. et al., 1974. O szucsasztvovanii nizkomolekuljarnogo faktora, obscsogo dlja razlicsnüh Mo-szoderzsascsih fermentov. *Dokl. AN SzSzSzR.* **217**. 228—231.
- MANHART, J. R. & WONG, P. P., 1979. Nitrate reductase activities of rhizobia and the correlation between nitrate reduction and nitrogen fixation. *Canad. J. Microbiol.* **25**. 1169—1174.
- RANDALL, D. D., RUSSEL, W. J. & JOHNSON, D. K., 1978. Nodule nitrate reductase as a source of reduced nitrogen in soybean *Glycine max*. *Physiol. Plant.* **44**. 325—329.
- ROMANOV, V. I. et al., 1976. Szvjaz' aktivnoszti nitratreduktazü bakteroidov *Rhizobium* sz dühaniem i azotfikszaciej. *Fiziol. Raszt.* **3**. 617—619.
- TATAROVA, A. K., L'VOV, N. P. & SUGAEV, N. O., 1976. O szootnosenii nitrogenazü i nitratreduktazü v kletkah azotobaktera. *Izv. TSzHA.* **3**. 24—27.

Érkezett: 1985. szeptember 2.

